

Isolasi Protoplas secara Enzimatis pada Tanaman Kecapir

Imron Riyadi

Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia,
Jl. Jabaru II No. 21, Pasir Kuda, Ciomas Bogor

Telp. (0251) 8633080; E-mail: imron_riyadi@yahoo.co.id; imron@ibriec.org

Diajukan: 1 September 2009; Diterima: 29 Maret 2010

ABSTRACT

Protoplast Isolation of Winged Bean Using Enzymes. The kind and concentration of enzyme that appropriate affected isolation process and result of plant protoplast. The research was conducted to enhance the protoplast rendements of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) that was isolated by *Cellulase RS* and *Macerozyme R-10* enzyme as single and its combination in a solution. Concentrations of enzyme used were as much as 2.0-3.0% w/v for *Cellulase RS* and 0.4-0.6% w/v for *Macerozyme R-10*. The solution containt mannitol 25 mM as an osmotycum. Isolation process was done on shaker with 50 rpm (rotation per minute) speed in dark room for 5 hours. Results showed that C3 treatment (concentration of *Cellulase RS* enzyme as much as 3.0% w/v) resulted protoplasts density 3.49×10^5 protoplasts/g fresh weight of hypocotyl and M2 treatment (concentration of *Macerozyme R-10* enzyme as much as 0.5% w/v) resulted 3.19×10^5 protoplasts/g. Whereas the best combined enzymes treatment was achieved by C3M2 (combination between *Cellulase RS* as much as 3.0% and *Macerozyme R-10* enzyme as much as 0.5% w/v) which resulted protoplasts density 4.94×10^5 protoplasts/g fresh weight of hypocotyl. The protoplast was intact and viable.

Keywords: *Psophocarpus tetragonolobus* L., protoplasts, isolation, rendemen, density, *Cellulase RS*, *Macerozyme R-10*.

ABSTRAK

Jenis dan konsentrasi enzim yang tepat berpengaruh terhadap keberhasilan proses isolasi dan rendemen protoplas tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan rendemen protoplas tanaman kecapir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) yang diisolasi dengan enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* secara tunggal maupun kombinasi kedua enzim dalam satu larutan. Konsentrasi enzim yang digunakan adalah 2,0-3,0% b/v untuk *Cellulase RS* dan 0,4-0,6% b/v untuk *Macerozyme R-10*. Zat osmotikum yang digunakan adalah mannitol 25 mM. Proses isolasi dilakukan di atas pengocok dengan kecepatan 50 ppm (putaran per menit) dalam kondisi gelap selama 5 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan C3 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 3,0% b/v) menghasilkan densitas $3,49 \times 10^5$ protoplas/g bobot segar mesofil daun, dan perlakuan M2

(konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v) menghasilkan densitas $3,19 \times 10^5$ protoplas/g. Secara keseluruhan, perlakuan terbaik ditunjukkan oleh C3M2 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 2,5% dan *Macerozyme R-10* 0,5% b/v) yang menghasilkan densitas $4,94 \times 10^5$ protoplas/g bobot segar hipokotil. Protoplas yang diperoleh terlihat utuh dan viabel.

Kata kunci: *Psophocarpus tetragonolobus* L., protoplas, isolasi, rendemen, densitas, *Cellulase RS*, *Macerozyme R-10*.

PENDAHULUAN

Tanaman kecapir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) telah lama dikenal sebagai sayuran dari golongan kacang-kacangan yang mengandung gizi cukup baik, terutama protein nabati (Djarmiko, 1986). Selain sebagai sumber sayuran, tanaman ini merupakan sumber karbohidrat yang terdapat pada bagian umbinya (Anonim, 2008). Tanaman kecapir juga bermanfaat mengendalikan gulma pada areal pertanian dan perkebunan, seperti alang-alang, rumput-rumputan, dan teki (Rismunandar, 1983) serta berperan sebagai penutup tanah pada lahan perkebunan kelapa sawit dan karet (Anonim, 2008). Bahkan biji kecapir berpotensi sebagai bahan baku tempe, susu, dan minyak goreng. Minyak goreng dari kecapir mempunyai keunggulan dibandingkan dengan minyak goreng dari kelapa sawit, yaitu warna, rasa, bau yang lebih sedap, dan dapat disimpan lebih lama (Djarmiko, 1986). Dengan demikian, tanaman kecapir mempunyai potensi untuk dikembangkan dalam skala besar untuk mensuplai bahan industri produk kecapir. Untuk mendukung usaha pengembangan kecapir dalam skala besar, diperlukan bahan tanam atau bibit yang berkualitas tinggi dan seragam. Pengembangan embriogenesis somatik mempunyai peluang dalam memperbanyak bibit unggul dan seragam pada waktu relatif singkat dengan jumlah besar (Tahardi *et al.*, 2000).

Salah satu metode pemuliaan tanaman yang dapat dilakukan dengan waktu relatif cepat adalah teknik isolasi protoplas yang berperan penting dalam menyeleksi tanaman unggul. Di samping itu, teknik ini dapat dijadikan metode pembuatan tanaman hibrida baru dalam waktu yang relatif lebih cepat. Isolasi protoplas merupakan teknik awal dari beberapa tahapan dalam melakukan fusi protoplas atau hibridisasi somatik untuk merakit bibit unggul (Suryowinoto, 1989; Kanchanapoom *et al.*, 2001).

Dalam mekanisme isolasi protoplas tanaman, salah satu faktor penting yang menentukan tingkat keberhasilan adalah proses penghilangan atau pelisisan dinding sel dan mendapatkan protoplas yang utuh (*intact*). Dinding sel yang masih muda biasanya tersusun dari zat pektin dan selulosa, sehingga untuk melisiskan zat penyusun dinding sel tersebut diperlukan zat yang dapat menghancurkan atau melarutkannya. Jenis enzim yang dapat digunakan untuk melisiskan zat penyusun dinding sel adalah *Pectinase* dan *Cellulase* karena *Pectinase* dapat berfungsi melarutkan pektin sedangkan *Cellulase* melarutkan selulosa (Evans dan Bravo, 1983; Mazarei *et al.*, 2008).

Pemakaian enzim *Pectinase* dan *Cellulase* telah berhasil dilakukan untuk mengisolasi protoplas tanaman *Solanum* sp. (Tan, 1987), *Hyperatum perforatum* L. (Saker *et al.*, 1999), *Dendrobium pompadour* (Kanchanapoom *et al.*, 2001), *Arabidopsis thaliana* (Sheen, 2002), *Echinacea augustifolia* (Liqing *et al.*, 2005), *Panicum virgatum* L. (Mazarei *et al.*, 2008), dan masih banyak lagi pemakaian enzim tersebut dengan tujuan untuk mengisolasi protoplas. Konsentrasi enzim yang digunakan berkisar antara 1-3% w/v untuk *Cellulase* dan 0,2-1,0% w/v untuk *Macerozyme*. *Macerozyme* merupakan salah satu enzim *Pectinase* yang sering digunakan untuk maserasi (*maceration*), atau memisahkan agregat sel menjadi sel-sel tunggal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menentukan konsentrasi enzim *Cellulase* RS dan *Macerozyme* R-10 serta komposisi kedua enzim terbaik untuk isolasi protoplas tanaman kecipir.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah biji kecipir unggul lokal yang diambil dari Desa Juman-toro, Kecamatan Jumapolo, Kabupaten Karang Anyar, Jawa Tengah. Biji tersebut dikecambahkan secara *in vitro* dengan media kapas basah dalam erlenmeyer atau botol. Pengecambahan benih dilakukan pada kondisi aseptik dalam ruang terang selama 15 hari. Kecambah yang telah mempunyai dua helai daun atau lebih diseleksi untuk dijadikan donor protoplas. Organ yang digunakan sebagai donor protoplas adalah bagian hipokotil. Sebelum dikecambahkan, benih disterilisasi dengan zat hipoklorit (*Baycline*) dengan konsentrasi 50%.

Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam proses isolasi protoplas terdiri atas: (1) *EM-medium* (*elution medium*) atau media elusi, yaitu media yang telah dicampur kedua enzim dengan konsentrasi yang sesuai dengan perlakuan yang digunakan untuk proses isolasi protoplas dari hipokotil kecipir. Macam bahan dan konsentrasi enzim yang digunakan disajikan pada Tabel 1 dan (2) *CPW-medium* atau medium pencuci yang biasa disebut *PM-medium* (*purification medium*) atau media pemurni/pembersih. Medium ini digunakan untuk mencuci dan memurnikan protoplas hasil isolasi dari zat enzim, sehingga protoplas tersebut dalam kondisi bersih/murni dan siap dikulturkan atau untuk proses selanjutnya, misalnya untuk fusi atau transfer organela. Macam bahan dan konsentrasi *CPW-medium* atau *PM-medium* disajikan pada Tabel 2.

Prosedur Kerja

Kecambah tanaman kecipir yang berumur 15 hari diambil bagian hipokotilnya, kemudian dikumpulkan sebagai bahan sumber protoplas. Hipokotil yang diperlukan setiap perlakuan adalah 0,3 g yang sebelumnya dipotong/diiris tipis selebar ± 1 mm, selanjutnya dimasukkan ke dalam 2 ml larutan *EM-medium*, kemudian diinkubasi dalam keadaan gelap selama 5 jam sambil dikocok di atas *gytoric*

Tabel 1. Komposisi *EM-medium* atau medium untuk isolasi protoplas.

Nama bahan	Konsentrasi (sesuai perlakuan)		
	C1M1	C2M2	C3M3
<i>Cellulase RS</i> *	2,0%	2,5%	3,0%
<i>Macerozyme R-10</i> *	0,4%	0,5%	0,6%
Mannitol	25 mM	25 mM	25 mM
MES (Morpho-Ethana Sulfoxide)	1 mM	1 mM	1 mM
pH	5,8	5,8	5,8

*Enzim yang digunakan sebagai perlakuan.

Tabel 2. Komposisi *CPW-medium* atau medium pencuci.

Nama bahan	Konsentrasi
KH ₂ PO ₄	170,00 µM
KNO ₃	999,00 µM
CaCl ₂ .2H ₂ O	10,00 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	998,00 µM
KJ	0,96 µM
Cu SO ₄ .5 H ₂ O	1,00 µM
Mannitol	600,00 mM

shaker berkecepatan 50 rpm. Perlakuan enzim tersebut adalah variasi konsentrasi enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* yang masing-masing perlakuan terdiri atas tiga tingkat ditambah kontrol, sehingga pada penelitian ini terdapat 16 kombinasi perlakuan sebagai berikut:

1. C0M0 2. C0M1 3. C0M2 4. C0M3
5. C1M0 6. C1M1 7. C1M2 8. C1M3
9. C2M0 10. C2M1 11. C2M2 12. C2M3
13. C3M0 14. C3M1 15. C3M2 16. C3M3

C0 = tanpa enzim *Cellulase RS* (kontrol).

C1 = konsentrasi enzim *Cellulase RS* 2,0% b/v.

C2 = konsentrasi enzim *Cellulase RS* 2,5% b/v.

C3 = konsentrasi enzim *Cellulase RS* 3,0% b/v.

M0 = tanpa enzim *Macerozyme R-10* (kontrol).

M1 = konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,4% b/v.

M2 = konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v.

M3 = konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,6% b/v.

Untuk mendapatkan rendemen protoplas viable, larutan enzim beserta suspensi protoplas tersebut disaring dengan kain *Mary-cloth* mesh 200 µm. Suspensi protoplas yang diperoleh disentrifugasi dengan *centrifuge merk Hettich Universal* berkecepatan 1.000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dengan pipet dan dibuang, sedangkan endapan-

nya ditambah larutan *CPW-medium* sebanyak 1 ml, kemudian disentrifugasi lagi berkecepatan 1.000 rpm selama 5 menit. Protoplas akan mengapung di permukaan larutan, kemudian diambil secara hati-hati dengan pipet, kemudian ditempatkan dalam tabung tersendiri. Protoplas tersebut sudah murni, bersih dari larutan enzim, dan siap untuk dikulturkan atau difusikan. Untuk mengetahui densitas atau kerapatan rendemen protoplas hasil isolasi, suspensi protoplas tersebut ditetaskan dalam *Haemocytometer* untuk penghitungan densitasnya.

Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan dilakukan terhadap perolehan rendemen protoplas hasil isolasi. Jumlah protoplas dihitung dengan menggunakan alat *Haemocytometer*. Penelitian ini menggunakan metode faktorial dengan pola dasar rancangan acak lengkap. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Hasil rata-rata perlakuan yang berbeda diuji dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada taraf nyata 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

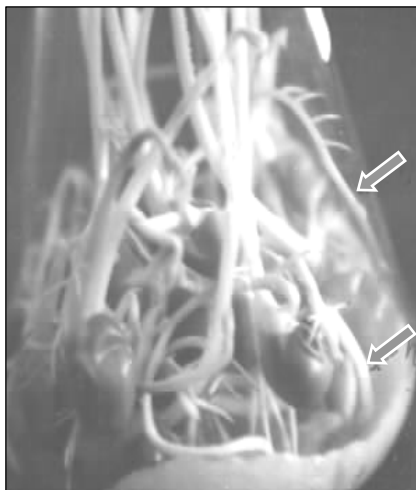
Pengecambahan Benih

Benih kecipir mulai berkecambah pada umur ± 7 hari setelah kultur. Kuncup daun mulai mekar (sepasang pertama) pada umur ± 11 hari setelah tanam dan warnanya masih putih-kekuningan (Gambar 1). Pada umur ± 15 hari, hipokotil tersebut diambil dan digunakan sebagai bahan atau donor protoplas yang akan diisolasi secara enzimatik.

Isolasi Protoplas

Hasil analisis menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* maupun kombinasi kedua enzim (interaksi) berpengaruh nyata terhadap perolehan rendemen protoplas kecipir hasil isolasi berdasar uji DMRT pada taraf nyata 5%.

Protoplas yang terisolasi sebagian besar menunjukkan bentuk *intact* atau utuh dengan membran transparan, sehingga organela atau bagian dalam sel dapat terlihat jelas (Gambar 2). Beberapa organela telah terlihat seperti butiran warna kemerah-merahan dan putih pekat. Organela berwarna kemerah-merahan ini digunakan sebagai marker atau penanda dalam identifikasi penghitungan rendemen protoplas hasil isolasi (Suryowinoto, 1990; Patnaik *et al.*, 1997).

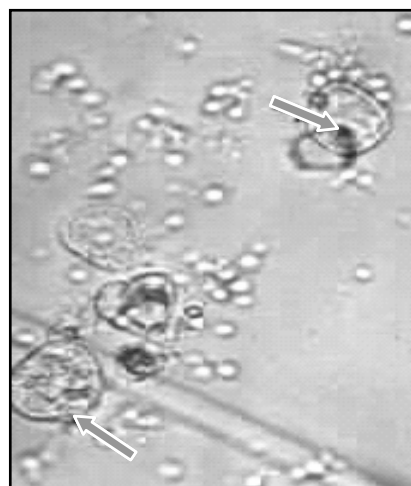


Gambar 1. Perkecambahan kecipir secara *in vitro* dengan media kapas basah pada umur ± 15 hari pada ruang terang. Tanda panah menunjukkan hipokotil yang digunakan sebagai donor protoplas.

Protoplas yang terkumpul tampak utuh meskipun melewati masa inkubasi dalam larutan enzim selama 3 jam sambil dikocok dengan kecepatan 50 rpm pada kondisi gelap dengan zat osmotikum berupa manitol 25 mM. Dengan demikian waktu inkubasi isolasi protoplas kecipir asal hipokotil selama 5 jam dapat dijadikan formula karena mampu memberikan protoplas yang baik. Demikian juga mannitol 25 mM yang digunakan sebagai osmotikum atau sering disebut sebagai zat antipecah (*anti blasting*) mampu menjaga kestabilan tekanan antara sitoplasma dengan larutan enzim, sehingga protoplas tidak pecah (Suryowinoto, 1990; Kim dan Lee, 1996; Stoldt *et al.*, 1996; Mazarei *et al.*, 2008). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian isolasi protoplas karet yang dilakukan Nurhaimi-Haris *et al.* (1993), yang menggunakan manitol 6,5-8% sebagai osmotikum dalam larutan enzim yang dikocok dalam kondisi gelap.

Pengaruh Perlakuan Isolasi Enzim *Cellulase RS*

Rendemen protoplas hasil isolasi pengaruh perlakuan beberapa konsentrasi *Cellulase RS* yang diuji berdasarkan DMRT pada taraf nyata 5% menunjukkan perbedaan yang signifikan (Tabel 3). Rendemen protoplas tertinggi dicapai oleh perlakuan C3 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 3,0%) sebesar $3,49 \times 10^5$ protoplas/g dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Rendemen protoplas terendah ditunjukkan oleh perlakuan C0 (kontrol), yaitu $0,32 \times 10^5$ protoplas/g.



Gambar 2. Protoplas kecipir hasil isolasi asal hipokotil.

Pada Tabel 3 diketahui bahwa perlakuan enzim *Cellulase RS* dapat mengisolasi protoplas dengan rendemen cukup tinggi. Hal ini membuktikan enzim *Cellulase RS* mampu mengisolasi protoplas kecipir asal hipokotil secara tunggal (tanpa dikombinasi dengan enzim lain). *Cellulase RS* merupakan salah satu jenis enzim yang berfungsi melarutkan dinding sel berupa selulosa. Pengocokan selama 5 jam pada kondisi gelap diduga membantu mempercepat proses isolasi protoplas kecipir, sehingga meningkatkan rendemen protoplas (Pedroso dan Pais, 1995; Kim dan Lee, 1996; Patnaik *et al.*, 1997).

Tabel 3 juga menunjukkan adanya peningkatan rendemen densitas protoplas kecipir seiring dengan meningkatnya konsentrasi enzim *Cellulase RS*. Hal ini diduga proses pelarutan dinding sel selulosa dan derivat-derivatnya dipengaruhi oleh konsentrasi enzim *Cellulase RS*. Pada proses isolasi ini, konsentrasi tertinggi (3%) merupakan konsentrasi yang tepat dan optimum sehingga menghasilkan rendemen protoplas tertinggi. Suryowinoto (1990) dan Patnaik *et al.* (1997) mengemukakan bahwa untuk melarutkan dinding sel yang tersusun atas selulosa digunakan enzim *Cellulase*.

Pengaruh Perlakuan Isolasi Enzim *Macerozyme R-10*

Rendemen protoplas hasil isolasi pengaruh perlakuan beberapa konsentrasi *Macerozyme R-10* yang diuji berdasarkan DMRT pada taraf nyata 5% menunjukkan perbedaan yang signifikan (Tabel 4). Rendemen protoplas kecipir tertinggi dicapai oleh perlakuan M2 (konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,5%) sebesar $3,19 \times 10^5$ protoplas/g. Rendemen protoplas terendah diperoleh pada perlakuan M0 (kontrol), sebesar $0,84 \times 10^5$ protoplas/g. Perlakuan M2 (enzim *Macerozyme R-10* 0,5% b/v) memberikan rendemen protoplas tertinggi. Hal ini diduga karena konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang tepat dan optimum untuk hipokotil kecipir. Pada konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* yang lebih tinggi (M3 0,6% b/v), rendemen protoplas lebih rendah ($2,89 \times 10^5$ protoplas/g bobot segar hipokotil) dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* 0,4% b/v (M1) dengan rendemen sebesar $2,54 \times 10^5$ protoplas/g. Hal ini sesuai dengan penelitian Nurhaimi-Haris *et al.* (1993), yang menggunakan enzim *Macerozym* dengan konsentrasi 0,5% untuk mengisolasi protoplas tanaman karet.

Macerozyme R-10 merupakan salah satu jenis enzim *Pectinase* yang berfungsi melarutkan dinding

Tabel 3. Uji jarak berganda Duncan dengan taraf nyata 5% pada perlakuan konsentrasi enzim *Cellulase RS* terhadap rendemen protoplas kecipir.

Konsentrasi enzim <i>Cellulase RS</i> (%)	Rata-rata densitas protoplas (g)*
0	0,32 d
2,0	2,68 c
2,5	2,97 b
3,0	3,49 a

*Angka rata-rata dikalikan 10^5 .

Angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf nyata 5% menurut DMRT.

Tabel 4. Uji jarak berganda Duncan dengan taraf nyata 5% pada perlakuan konsentrasi enzim *Macerozyme R-10* terhadap rendemen protoplas kecipir.

Konsentrasi enzim <i>Macerozyme R-10</i> (%)	Rata-rata densitas protoplas (g)*
0	0,84 c
0,4	2,54 b
0,5	3,19 a
0,6	2,89 b

*Angka rata-rata dikalikan 10^5 .

Angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf nyata 5% menurut DMRT.

sel primitif yang tersusun atas zat *pectin* (Kim dan Lee, 1996; Kanchanapoom *et al.*, 2001; Mazarei *et al.*, 2008). Enzim *Macerozyme* digunakan untuk memisahkan atau maserasi jaringan tanaman sehingga sel-sel tersebut terlepas menjadi sel-sel tunggal. Akhirnya enzim tersebut melarutkan dinding sel yang masih tersisa sehingga terbentuk protoplas transparan berbentuk bulat dan utuh (Suryowinoto, 1990; Pedroso and Pais, 1995; Patnaik *et al.*, 1997; Saker *et al.*, 1999).

Interaksi Perlakuan antara Enzim *Cellulase RS* dengan *Macerozyme R-10*

Perlakuan kombinasi antara kedua enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* dapat meningkatkan rendemen protoplas cukup tinggi dibandingkan dengan pengaruh enzim secara tunggal. Rendemen protoplas hasil isolasi pengaruh perlakuan kombinasi kedua enzim tersebut menunjukkan perbedaan yang nyata (Tabel 5). Rendemen protoplas tertinggi dicapai oleh perlakuan C3M2 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* 3% dikombinasikan dengan *Macerozyme R-10* 0,5%) sebesar $4,94 \times 10^5$ protoplas/g. Rendemen protoplas terendah diperoleh dari perlakuan C0M0 (kontrol), $0,12 \times 10^5$ protoplas/g.

Hasil interaksi terbaik enzim *Cellulase RS* dengan *Macerozyme R-10* dicapai oleh perlakuan

C3M2 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* sebesar 3% dan *Macerozyme R-10* 0,5%) yang menghasilkan densitas tertinggi sebesar $4,94 \times 10^5$ protoplas/g hipokotil kecipir. Hal ini diduga karena interaksi kedua enzim tersebut dengan konsentrasi enzim *Cellulase RS* 3,0% dan *Macerozyme R-10* 0,5% merupakan perlakuan kombinasi enzim dengan konsentrasi paling tepat dan optimum. Tingginya rendemen protoplas kecipir yang terisolasi akibat pengaruh perlakuan interaksi kedua enzim tersebut, menunjukkan bahwa antara enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* terdapat interaksi positif. Keadaan ini menyebabkan pada penggabungan kedua enzim terjadi saling mempengaruhi untuk meningkatkan rendemen protoplas yang terisolasi dibandingkan dengan pengaruh enzim secara tunggal. Hal ini sesuai dengan penelitian Suryowinoto (1996) dan Stoldt *et al.* (1996) yang mengemukakan bahwa untuk proses isolasi protoplas lebih baik bila menggunakan kombinasi enzim *Cellulase* dengan enzim *Pectinase* seperti *Macerozyme*. Kombinasi enzim-enzim tersebut akan meningkatkan densitas protoplas hasil isolasi.

Protoplas kecipir hasil isolasi menunjukkan kondisi yang baik (Gambar 2), berbentuk cenderung bulat, utuh, dan viabel dalam jumlah yang cukup (memenuhi persyaratan densitas untuk proses se-

Tabel 5. Uji jarak berganda Duncan dengan taraf nyata 5% pada interaksi antara perlakuan konsentrasi enzim *Cellulase RS* dengan *Macerozym R-10* terhadap rendemen protoplas kecipir.

Konsentrasi enzim (%)		Rata-rata densitas protoplas (g)*
<i>Cellulase RS</i>	<i>Macerozyme R-10</i>	
0	0	0,12 i
0	0,4	0,31 i
0	0,5	0,37 i
0	0,6	0,47 h
2	0	0,84 h
2	0,4	2,71 e
2	0,5	3,46 d
2	0,6	3,69 c
2,5	0	1,09 g
2,5	0,4	3,30 d
2,5	0,5	3,97 b
2,5	0,6	3,52 c
3	0	1,32 f
3	0,4	3,83 b
3	0,5	4,94 a
3	0,6	3,88 b

*Angka rata-rata dikalikan 10^5 .

Angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT.

lanjutnya). Hal ini berarti protoplas tersebut siap dikulturkan atau diperlakukan lebih lanjut dengan tingkat keberhasilan yang lebih tinggi. Perlakuan lanjut dari protoplas hasil isolasi adalah kultur protoplas, transfer organela dan fusi protoplas intragenerik maupun intergenerik (Kim dan Lee, 1996; Suryowinoto, 1996). Pada Gambar 2 terlihat bahwa protoplas kecipir tampak transparan sehingga organela dalam protoplas terlihat dengan adanya butiran yang berwarna agak kemerahan, sehingga dapat digunakan sebagai *marker* atau tanda pada proses fusi protoplas dengan protoplas tanaman lain yang memiliki *marker* khusus.

KESIMPULAN

Protoplas tanaman kecipir dapat diisolasi dari hipokotil dengan menggunakan enzim *Cellulase RS* dan enzim *Macerozyme R-10* secara tunggal maupun kombinasi keduanya. Pada perlakuan enzim *Cellulase RS* secara tunggal, rendemen protoplas tertinggi dicapai oleh perlakuan C3 (konsentrasi 3% b/v) dengan densitas $3,49 \times 10^5$ protoplas/g bobot segar. Pada enzim *Macerozyme R-10*, rendemen protoplas tertinggi sebesar $3,19 \times 10^5$ protoplas/g dicapai oleh perlakuan M2 (konsentrasi 0,5% b/v). Perlakuan interaksi antara enzim *Cellulase RS* dan *Macerozyme R-10* mampu menghasilkan rendemen protoplas lebih tinggi. Perlakuan interaksi terbaik kedua enzim dicapai oleh perlakuan C3M2 (konsentrasi enzim *Cellulase RS* sebesar 3,0% b/v dan *Macerozyme R-10* sebesar 0,5% b/v) dengan densitas $4,94 \times 10^5$ protoplas/g.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2008. Kecipir, indahnya dengan segudang manfaat. [http://javascript:realview\('detail_images.asp?act=1&id=5042&imaged=11638','detail_images','516','500'\)](http://javascript:realview('detail_images.asp?act=1&id=5042&imaged=11638','detail_images','516','500')). [7 Februari 2008]
- Djarmiko, H. 1986. Kecipir, Budi Daya, Guna, dan Olahannya. CV. Simplex. Jakarta. hlm. 1-30.
- Evans, D. and A. Bravo. 1983. Protoplast isolation and culture, technique for propagation and breeding. Macmillan Publishing CD, New York. p. 124-145.
- Kanchanapoom, K., S. Jantaro, and D. Rakchad. 2001. Isolation and fusion of protoplast from mesophyll cells of *Dendrobium pompadour*. ScienceAsia 27:29-34.
- Kim, J.C. and E.A. Lee. 1996. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Dianthus superbus*. Plant Cell Rep. 16:18-21.
- Liqing, Z., W. Bochu, Z. Jing, C. Lingxi, D. Chuanyun, and D. Chuanren. 2005. Protoplast isolation of Callus in *Echinacea augustifolia*. Colloids and Surface. Biointerfaces 44(1):1-5.
- Mazarei, M., H. Al-Ahmad, M.R. Rudis, and C.N. Stewart. 2008. Protoplast isolation and transformation gene expression in switchgrass, *Panicum virgatum* L. Biotechnol. J. 3:354-359.
- Nurhaimi-Haris, A. Darussamin, dan W.A. Dodd. 1993. Isolasi protoplas karet (*Hevea brasiliensis*, Muell. Arg.) dari kalus dan suspensi sel. Menara Perkebunan 61(2):25-31.
- Patnaik, J., S. Sahoo, and B.K. Debata. 1997. Somatic embryogenesis and planlet regeneration from cell suspension of palmarosa grass (*Cymbopogon martinii*). Plant Cell Rep. 16:430-434.
- Pedroso, M.C. and M.S. Pais. 1995. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Camellia japonica*. In Vitro Cell. Dev. Biol. 31:31-35.
- Rismunandar. 1983. Kecipir, Penghasil Protein dan Karbohidrat yang Serba Guna. Sinar Baru. Bandung. hlm. 7-24.
- Saker, S.S., K.H. Newman, E.M. Badawy, M.K. El-Bahr, and H.S. Taha. 1999. Isolation and culturing of protoplast from *Hypericum perforatum* L. Arab J. Biotech. 2(2):227-234.
- Sheen, J. 2002. A Transient Expression Assay Using Arabidopsis Mesophyll Protoplast. Dept. of Molecular Biology, Wellman 11, MGH, Boston. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>. [6 Agustus 2007].
- Suryowinoto, M. 1989. Fusi Protoplas. PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 3-260.
- Suryowinoto, M. 1990. Petunjuk Laboratorium, Pemuliaan Tanaman secara *In Vitro*. PAU Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 213-294.
- Suryowinoto, M. 1996. Prospek Kultur Jaringan dalam Perkembangan Pertanian Modern. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm. 2-18.
- Stoldt, A., X.H. Wang, and H. Lorz. 1996. Primary callus as source of totipotent barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Report 16:137-141.
- Tahardi, J.S., T. Raisawati, I. Riyadi, and W.A. Dodd. 2000. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in tea by temporary liquid immersion. Menara Perkebunan 68(1):1-9.
- Tan, M.L.C. 1987. Somatic Hybridization and Cybridization in Some Solanaceae. Free University Press. Amsterdam. p. 57-93.